



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑯ **Offenlegungsschrift**  
⑯ **DE 199 06 352 A 1**

⑯ Int. Cl. 6:  
**G 01 N 27/00**  
G 01 N 33/48  
G 01 N 33/53

⑯ Aktenzeichen: 199 06 352.4  
⑯ Anmeldetag: 17. 2. 99  
⑯ Offenlegungstag: 22. 7. 99

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

⑯ Anmelder:

Hennes, Kilian, Dr., 78462 Konstanz, DE

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Rechercheantrag gem. Paragraph 43 Abs. 1 Satz PatG ist gestellt

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Nachweis- und Zählgerät für suspendierte biologische Partikel

⑯ Technische Aufgabe und Zielsetzung

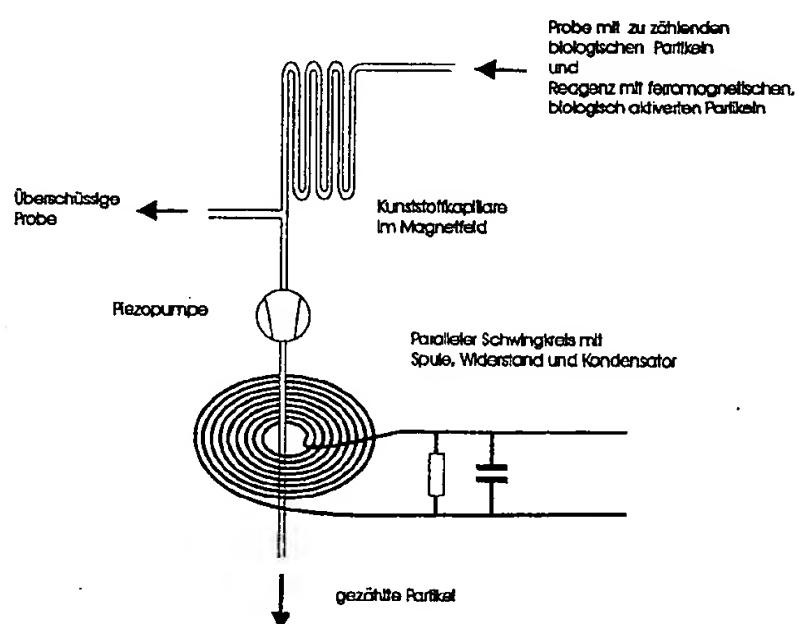
Mit der offenbarten Technik werden Partikel wie Bakterien, Zellen oder Zellbestandteile in wässrigen Lösungen nachgewiesen und gezählt. Die neue Technik ermöglicht eine Miniaturisierung des automatischen Partikelzählverfahrens.

**Lösung**

Die Partikel werden vor der Messung durch die Reaktion mit monovalenten antikörper- bzw. virenbeschichteten ferromagnetischen Partikeln markiert. Die induktive Messung beruht auf dem Passieren der mit den biologischen Partikeln aggregierten ferromagnetischen Partikel durch die Mikrospule eines elektronischen Schwingkreises. Die beim Passieren auftretenden Resonanzereignisse werden gezählt.

**Anwendungsgebiet**

Das Gerät kann in der Medizin, Mikrobiologie und Hygiene eingesetzt werden. Es können zum Beispiel Blutzellen ausgezählt werden. Es können ökologisch relevante Mikroorganismen ausgezählt oder krankheitserregende Keime nachgewiesen werden.



**DE 199 06 352 A 1**



**DE 199 06 352 A 1**

## Beschreibung

Die Zählung von Bakterien, Blutzellen oder Zellbestandteilen in wässrigen Lösungen erfolgt bisher mittels Durchflußzytometer oder Coultercounter. Hier werden die entsprechenden Partikel gefärbt und anhand von optischen Signalen identifiziert oder durch kapazitive Messungen gezählt.

Um den apparativen Aufwand bei der optischen Messung zu umgehen und eine höhere Spezifität gegenüber der kapazitiven Messung zu erreichen, wird für den Nachweis des einzelnen Partikels ein anderes Meßprinzip eingesetzt: Die Messung der Induktivitätsänderung einer Mikrospule aus Metall. Da biologische Partikel aber eine Permeabilitätskonstante  $\mu$  von annähernd 1 haben, müssen diese zum Nachweis und zur Zählung mittels Spule zuvor mit induktivitätsändernden Substanzen markiert werden. Diese Markierung geschieht durch die immunologische, phagologische oder molekularbiologische Ankopplung von ferromagnetischen Partikeln, welche monovalent entweder mit Antikörpern, mit Virus-Andockmolekülen oder mit Gensonden an Spacermolekülen verbunden sind.

Die Kopplung der ferromagnetischen Marker erfolgt in einer Vorrichtung, welche gleichzeitig eine Anreicherung der zu zählenden Partikel ermöglicht: Die Marker werden in einer Teflonkapillare mittels einem Elektromagnet als Sorptions-Schicht festgehalten, bis die gesamte Probe in die Kapillare gepumpt wurde und gleichzeitig die überschüssige Probe aus der Kapillare herausgelaufen ist. Hierauf wird der Magnet ausgeschaltet, damit die Marker frei diffundieren und die Oberfläche der biologischen Partikel sättigen können. Darauf wird der Kapillaren-Inhalt mit einer piezoelektrischen Pumpe durch eine Metallspule gepumpt, die als Spirale auf eine Leiterplatte geätzt wurde und mit Kondensator und Widerstand als Schwingkreis geschaltet ist. Der Schwingkreis wird mit einer Frequenz angeregt die derjenigen Eigenschwingfrequenz entspricht, welche entsteht, wenn sich ein durchschnittlich markierter biologischer Mikropartikel in der Spule befindet. Dadurch entsteht im Schwingkreis immer dann eine Resonanzschwingung, wenn ein entsprechender Mikropartikel durch die Spule tritt.

Ein Beispiel für die Anwendung dieses Verfahrens ist der Nachweis von Kolibakterien in Wasserproben (siehe schematische Zeichnung, Vermerk 1). Hierzu werden monovalente primäre E.-coli-spezifische Antikörper mit an magnetische Beads gekoppelten sekundären Antikörpern konjugiert. Die Suspension dieser Konjugate (2) wird in die Teflon-Kapillare (3) gepumpt und mittels Elektromagnet (4) dort fixiert. Beim Durchströmen der Kapillare mit der zu untersuchenden Wasserprobe werden Kolibakterien über die primären Antikörper an den Konjugaten festgehalten. Nach dem Abschalten des Magneten kann die Suspension von magnetisch markierten Kolibakterien durch die Meßspule (5) gepumpt werden. Die Anzahl der Resonanz-Ereignisse im angeschlossenen Schwingkreises entspricht der Anzahl der Kolibakterien in der ursprünglichen Wasserprobe. Durch den Einsatz dieses Gerätes und der entsprechenden Konjugate ist es möglich, ohne den aufwendigen Einsatz der Durchflußzytometrie Bakterien automatisch zu zählen. Des weiteren ist es möglich, mit dieser Meßmethode eine Miniaturisierung des Nachweisgerätes zu erreichen.

## Patentansprüche

1. Nachweis- und Zählgerät für suspendierte biologische Mikropartikel in flüssigen Proben, **dadurch gekennzeichnet**, daß die biologischen Partikel immunologisch, phagologisch oder molekularbiologisch mit Partikeln verbunden werden, welche beim anschließen-

den Durchströmen einer Metallspule meßbare undzählbare Induktivitätsänderungen bewirken.

2. Zählgerät nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß induktivitätsändernde, ferromagnetische Partikel vor dem Durchströmen der Metallspule mittels Elektromagnet in einer Kunststoffkapillare festgehalten werden und dort mit den in die Kapillare einströmenden biologischen Mikropartikeln verbunden werden, während die Probe, in welcher diese enthalten waren, aus der Kapillare herausfließt.

3. Zählgerät nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallspule als Teil eines elektronischen Schwingkreises beim Durchströmen der induktivitätsändernden Partikel, Änderungen der Eigenschwingfrequenz bewirkt, die gezählt werden.

4. Verfahren für die Herstellung von biologisch aktivierte ferromagnetischen Partikeln, dadurch gekennzeichnet, daß monovalente primäre Antikörper mit ferromagnetischen Partikeln im mehrfachen Überschuß gemischt werden, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimentation in einer Zentrifuge aggregierte Partikel aus einem monovalenten primären Antikörper und antikörper-beschichteten ferromagnetischen Teilpartikeln abgetrennt werden.

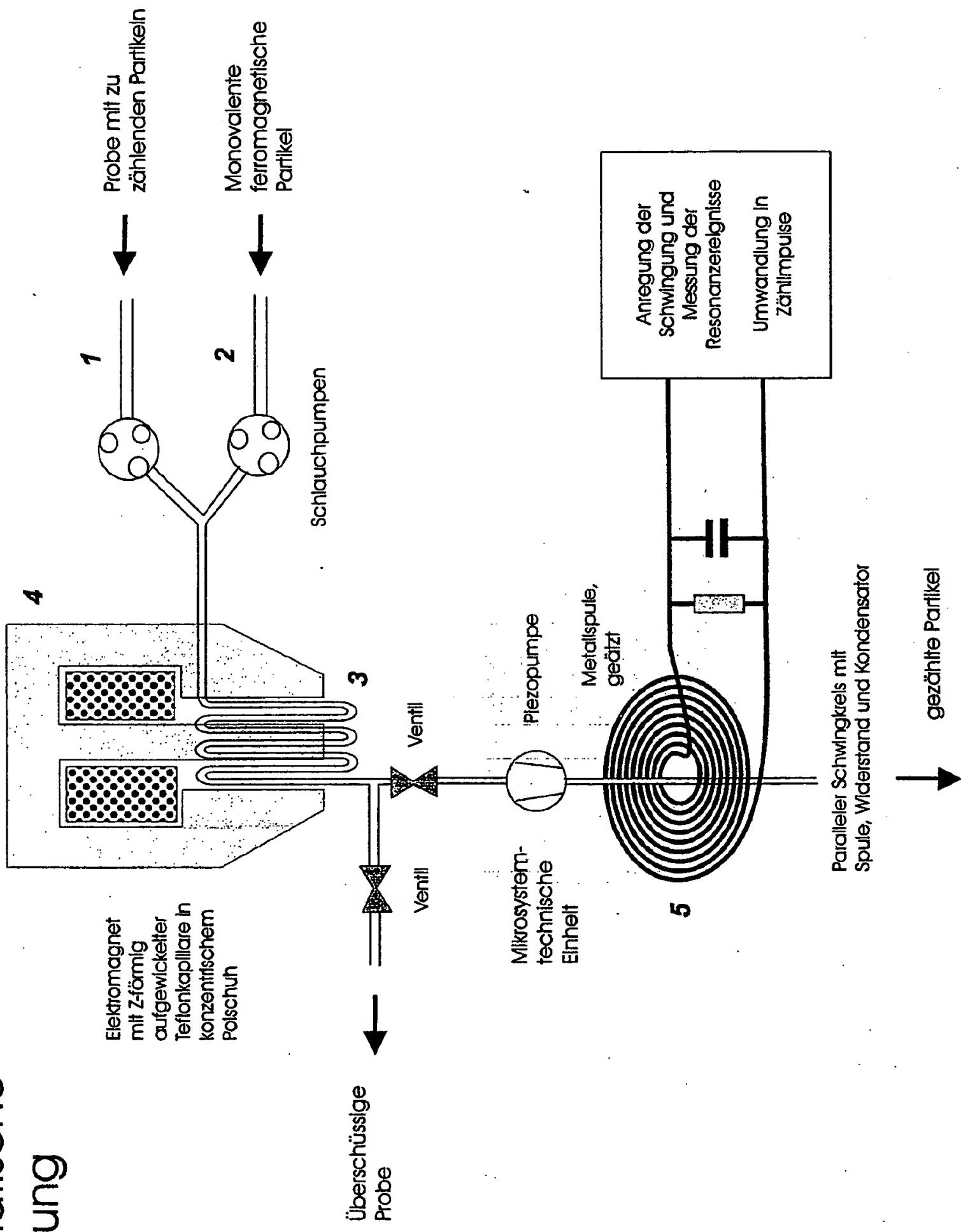
5. Verfahren nach Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle primärer Antikörper Viren verwendet werden, gegen deren Hüllproteine die sekundären Antikörper gerichtet sind.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

*This Page Blank (uspto)*

# Schematische Zeichnung



PUB-NO: DE019906352A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: DE 19906352 A1

TITLE: Apparatus to identify and count biological  
microparticles

PUBN-DATE: July 22, 1999

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
HENNES, KILIAN DR	DE

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
HENNES KILIAN DR	DE

APPL-NO: DE19906352

APPL-DATE: February 17, 1999

PRIORITY-DATA: DE19906352A ( February 17, 1999)

INT-CL (IPC): G01N027/00, G01N033/48 , G01N033/53

EUR-CL (EPC): G01N015/04 ; G01N015/10, G01N033/543 , G01N015/10

ABSTRACT:

CHG DATE=19991102 STATUS=O>Apparatus to identify and count suspended biological microparticles, in a liquid sample, uses a sample where the microparticles are bonded to particles immunologically, pathologically or microbiologically. The current flow from a metal coil gives them inductive changes which can be measured and they can be counted. The bonding particles, which can be changed by induction, are ferromagnetic and are held by an electromagnet (4) in a plastics capillary (3) before the metal coil current flow. The sample is passed through the capillary, where the biological microparticles bond with the ferromagnetic particles, and the liquid of the sample flows out of the capillary. The metal coil (5) is part of an electronic oscillation circuit. An Independent claim is included for an operation to give biologically activated ferromagnetic particles. Monovalent primary antibodies are mixed with ferromagnetic particles in a multiple surplus, which have been

coated with secondary antibodies. Using a centrifuge for partial sedimentation, particles are gathered and separated into particles of a monovalent primary antibody and ferromagnetic particles coated with antibodies. Preferred Features: Viruses can be used instead of the primary antibodies, with the secondary antibody directed against their protein shrouding.